

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE HISTERECTOMÍA PARA LA ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN UNA COLONIA DE RATONES CF-1 DESTINADOS A LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

M Ayala¹, S Milocco¹, F Maschi¹, C Galosi^{2,3},
M Cagliada¹, C Carbone¹

¹Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio

²Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

³Investigador Adjunto CIC Pcia de Bs. As. Argentina.

Resumen: Muchos patógenos que afectan a los ratones interfieren en los resultados de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Para la eliminación de agentes infecciosos en colonias se utiliza la técnica de derivación por histerectomía. El objetivo de este trabajo fue eliminar mediante esta técnica los siguientes patógenos: el virus de la Hepatitis Murina (MHV), la bacteria *Corynebacterium kutscheri*, y los parásitos *Giardia muris*, *Spironucleus muris*, y *Syphacia obvelata* de una colonia de ratones CF1:Crl. Se utilizaron hembras nodrizas C57BL/6J libres de patógenos específicos. Para verificar la descontaminación de la colonia se realizaron 4 controles microbiológicos. Los resultados fueron negativos en todos los casos. Se concluyó que esta técnica permite eliminar los patógenos citados de una colonia de ratones infectados.

Palabras claves: histerectomía, nodrizas, ratón, cabina aisladora.

THE USE OF HYSTERECTOMY TECHNIQUE AS A WAY TO ELIMINATE PATHOGENS FROM AN EXPERIMENTAL MICE COLONY

Abstract: A lot of pathogens which must be absent in experimental mice colonies, since they produce interference in the results. This study describes the derivation by hysterectomy as a mean of effective elimination of pathogens such as: Mouse hepatitis virus, *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spironucleus muris* and *Syphacia obvelata* from a CF:1 Crl colony. Specific pathogen free females C57BL/6J were chosen to perform this study and later used as foster mothers. Four microbiological tests were carried out in order to verify the decontamination. The results were negative in all the cases. It was concluded that by using this techniques it is possible to eliminate pathogens from an infected mice colony.

Key words: Hysterectomy, foster mothers, mouse, clean bench.

Fecha de recepción: 10/09/99

Fecha de aprobación: 07/11/05

Dirección para correspondencia: M Ayala, Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA. **E-mail:** mayala@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, quienes trabajaron con animales de experimentación infectados subclínicamente, observaban que sus ensayos no prosperaban, esto se debía en ocasiones a que los animales morían prematuramente y frecuentemente los resultados no eran los esperados. Esto sucedía en gran parte porque la mayoría de los animales convencionales están infectados con patógenos incluyendo ecto y endoparásitos, hongos, protozoos, bacterias y virus, y estos agentes interfieren en las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad en las que se utilizan como reactivo biológico.

En un principio se utilizó la quimioterapia para eliminar los microorganismos patógenos de una colonia, pero los resultados no fueron satisfactorios; como consecuencia de ello, surgieron nuevas técnicas como la remoción aséptica de los fetos de la madre por medio de la histerectomía en un ambiente controlado (1).

El fundamento se basa en que la placenta actúa como un filtro muy eficiente y protege a los fetos de la transmisión de casi todos los agentes bacterianos, micóticos, virales y parasitarios presentes en la madre infectada (2,3). Los patógenos comunes como el Virus de la Ectromelia, Virus de la hepatitis del ratón, protozoos, y otras bacterias de la flora normal de una colonia convencional no atraviesan la placenta. Sin embargo, hay algunos patógenos que la atraviesan como el virus de la Coriomeningitis linfocitaria, ciertas larvas de parásitos y algunas bacterias.

El objeto de este trabajo fue determinar la eficiencia de la técnica de histerectomía para la eliminación de los siguientes agentes patógenos: Virus de la Hepatitis Murina (MHV), *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spiroplasma muris*, y *Syphacia obvelata* que contaminaban a una colonia de ratones CF1:Crl de experimentación (1, 4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Grupo A: de nodrizas:

Se utilizaron 15 ratones hembras y 3 machos de la cepa C57BL/6J (libres de patógenos específicos) SPF de 6 semanas de edad, eligiéndose tal cepa por la capa de color, en este caso negro, para diferenciarla fácilmente de la cepa que interesa descontaminar.

Los animales se produjeron en el Biotorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de

la Universidad Nacional de La Plata, y se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, doce horas luz / doce horas oscuridad, la humedad relativa ambiente del 40-60 % y una ventilación forzada con 12 recambios de aire totales por hora. Se alojaron 5 hembras con un macho en cada caja de policarbonato (de 25 cm de largo por 15 cm de ancho y 15 cm de alto, con una reja de acero inoxidable) con lecho de viruta estéril. Se administró *ad libitum* agua autoclavada en mamaderas de vidrio con pico de acero inoxidable y alimento balanceado (Cooperación rata- ratón), extrusado y esterilizado por medio de autoclave.

Grupo B: animales a descontaminar:

Este grupo estuvo compuesto por 15 ratones hembras (donantes) y 3 machos del stock CF1: Crl de 6 semanas de edad provenientes de una colonia convencional de una institución privada, infectada con los siguientes patógenos: Virus de la hepatitis murina (MHV), *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Syphacia obvelata* y *Spiroplasma muris*.

Las hembras donantes se colocaron en grupos homosexuales con lo que se logró el anestro de las mismas y la posterior sincronización de los estros (efecto Whitten). Luego de una semana, se aparearon 5 hembras y 1 macho por caja, dos días más tarde que la fecha de apareamiento de las nodrizas y se confirmó la cubrición de las hembras mediante la presencia del tapón vaginal.

Estos animales fueron alojados en una habitación de cuarentena en las mismas condiciones de macro y microambiente que la de los animales SPF.

Técnica de histerectomía:

El primer paso de la operación fue la remoción del útero grávido de la madre en forma aséptica, para lo que se sacrificaron las hembras donantes por medio de tracción cervical. Posteriormente se depiló la superficie ventral y se las sumergió en solución antiséptica (cloruro de benzalconio al 0,5%) mantenida a 37°C , se las colocó de cúbito dorsal, se cubrió el abdomen con paños de campo y se les realizó una incisión sobre la línea media. Presionando suavemente sobre los flancos se extrajo el útero de la cavidad abdominal, se pinzaron los cuernos y el cuerpo para evitar hemorragias, se separaron los úteros grávidos de las hembras y se los colocó dentro de una cápsula de Petri con la solución antiséptica a 37°C , las placas fueron introducidas al área estéril (flujo laminar) a través de una trampa

germicida con solución desinfectante a 37 °C, donde fueron recibidas por dos operadores (1, 5, 6).

Dentro del área estéril se incidieron los úteros y se extrajeron los fetos, que fueron secados y resucitados, realizando masajes suavemente en la región torácica extrayéndose el líquido amniótico residual de las fosas nasales, hasta que la respiración fuera normal y los fetos tomaran un color rojo escarlata. Finalmente fueron colocados en las cajas con las nodrizas y alojados en una cabina aisladora.

Controles microbiológicos:

Para verificar la descontaminación de la colonia se realizaron 4 controles microbiológicos:

1° Control de las placentas: Se realizó un macerado de las mismas y se las sembró en agar sangre y caldo PPLO para diagnosticar la presencia o ausencia de *Pasteurella* sp. y *Mycoplasma* sp.

2° Control de las nodrizas: Se realizó luego del destete de los animales obtenidos por histerectomía. Se sangraron las hembras para diagnóstico del Virus Sendai, MHV, *Mycoplasma* sp., *Clostridium piliforme* y *Corynebacterium kutscheri*; se tomaron hisopados de la nariz y tráquea, y se sembraron en agar sangre y caldo PPLO para diagnosticar *Mycoplasma* sp. y *Pasteurella* sp. Las muestras de ciego se sembraron en agar Mc Conkey, agar Cetrimide y agar FNC para el diagnóstico de *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium kutscheri*.

3° Control de crías: Se realizó al 25% de las crías obtenidas por la operación cesárea. Se tomaron muestras de la misma manera que en el control anterior.

4° Control de primera generación (F1): Se realizó a la F1 nacida de los animales obtenidos por histerectomía. Las muestras se tomaron de la misma manera que en el segundo control.

Pruebas Parasitológicas: Se tomaron muestras de contenido duodenal y cecal para diagnosticar *Giardia muris* y *Spironucleus muris*; y se realizó un test de Graham para el diagnóstico de *Syphacia obvelata*.

Pruebas serológicas: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para diagnóstico de MHV, virus Sendai, *Mycoplasma* sp. y *Clostridium piliforme*, y aglutinación en placa (AP) para diagnóstico de *Corynebacterium kutscheri* (4, 7). Para todos los casos se utilizaron sueros positivos de referencia cedidos por National

Institute of Health of Japan (NIH).

RESULTADOS

Se obtuvieron 86 animales, 14 murieron y se destetaron 72. Los 14 animales que murieron no fueron aceptados por la nodriza. Todos los controles microbiológicos resultaron negativos a los patógenos que se pretendieron eliminar de la colonia infectada.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que la técnica de derivación por histerectomía es un método eficiente para la eliminación de los siguientes patógenos: Virus de la hepatitis murina, *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spironucleus muris*, *Syphacia obvelata*, confirmando que la placenta actúa como filtro para la mayoría de los patógenos.

Recomendamos en caso de emplear este método mantener aislados los animales obtenidos por histerectomía, hasta completar todos los controles microbiológicos correspondientes, esto permitirá asegurar que los mismos estén libres de microorganismos patógenos para poder introducirlos dentro de un área de producción de animales SPF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bleby J. Disease free (SPF) animals. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Fifth Edition. 1976.
2. Bohner H, Miller C. Studies on rearing the hamster germfree. In Germfree Research: Biological Effect of Gnotobiotic Environments (ed. J. B. Heneghan), pp.619-622. New York: Academic Press. 1973
3. Rouleau A, Kovacs H, Kunz W. Decontamination of rat embryos and transfer to specific pathogen-free recipients for the production of a breeding colony. Lab Anim Sci. 1993; 43: 611-615.
4. Coates M, Gustafsson B. The Germ Free Animal in Biomedical Research. Lab. Anim. Handbook 9. 1984.
5. Reyniers J, Trexler P, Ervin R. Rearing germfree albino rats. Lobound Report N° 1, pp. 1- 84. Notre Dame Univ. Press. 1946.
6. Reyniers J. Introduction to the general problem of isolation and elimination of contamination. In Micrurgical and Germfree Techniques, pp. 95-113. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas. 1943.
7. Hill A, Stalley P. *Mycoplasma pulmonis* infection with regard to embryo freezing and hysterotomy derivation. Lab Anim Sci. 1991; 41: 563-566.